

生物素链霉亲和素联合免疫层析用于 快速检测 NT-proBNP

孙宏浩¹ 梁玉芬^{1,2} 赵晓双¹ 黄玲² 廖天作¹

(1 湖北工业大学 生物工程与食品学院 湖北省工业发酵协同创新中心 发酵工程教育部重点实验室 武汉 430068;
2 江西中医药高等专科学校 医学基础部 抚州 344000)

摘要 为提高常规免疫层析技术的检测灵敏度,引入生物素-链霉亲和素系统,以荧光微球作为标记物,建立了一种新型快速定量检测 NT-proBNP 的方法.试验结果表明:新型试剂盒在 $0.02 \sim 30 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围能对 NT-proBNP 实现快速检测.在全血检测中,新型试纸条所测 NT-proBNP 浓度与雷度快速免疫分析仪定量检测结果具有很好的一致性.新型免疫层析试纸条大大提高了快速检测的准确性,可广泛用于床旁检验(POCTs)等临床诊断阶段.

关键词 生物素-链霉亲和素; 荧光免疫层析; N 末端脑钠肽前体; 即时检验

中图分类号 O657.3; TB383.1 文献标识码 A 文章编号 1672-4321(2018)02-0006-04

Biotin Streptavidin System Combined Immunochromatography for Rapid Detection of NT-proBNP

Sun Honghao¹, Liang Yufen^{1,2}, Zhao Xiaoshuang¹, Huang Ling², Liao Tianzuo¹

(1 Key Laboratory of Fermentation Engineering of Ministry of Education, Industrial Fermentation Collaborative Innovation Center of Hubei Province, School of Food and Biological Engineering, Hubei University of Technology, Wuhan 430068, China; 2 Department of Basic Medicine, Jiangxi College of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 34400, China)

Abstract In order to improve the sensitivity of conventional immunochromatography, a novel rapid and quantitative assay for NT-proBNP was established by introducing biotin-streptavidin system and using fluorescent microspheres as a marker. The results showed that the new kit could detect NT-proBNP rapidly in the range of $0.02 \sim 30 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$. In whole blood test, the NT-proBNP concentration measured by the new test strip was in good agreement with the quantitative detection results of the RadioMeter AQT90 FLEX analyzer. The new immunochromatographic test strip greatly improved the accuracy of rapid test, and may be widely used in clinical diagnosis such as bedside test (POCTs).

Keywords biotin-streptavidin; fluorescence immunochromatography; NT-proBNP; POCTs

NT-proBNP 是由脑钠肽原(pro-BNP)经内切酶酶切产生的一种无活性的 N 端多肽片段,主要存在于心肌细胞对心室壁的张力或局部缺血作出应答所产生的分泌物中^[1].大量研究表明:NT-proBNP 半衰期较短,稳定性强,可作为心力衰竭诊断测试的主要指标,在疾病诊断及预后评估阶段具有重要作用^[2].在患有心力衰竭和其他心血管疾病的患者体内,NT-proBNP 的浓度明显升高,且与心功能受损程度呈正相关^[3].对于 NT-proBNP 的定量检测,可用于心血管疾病的临

床诊断、预后判断及治疗效果评价^[4].目前,定量检测 NT-proBNP 的方法主要有:放射性免疫检测技术^[5]、酶联免疫吸附测定^[6]、电化学发光免疫分析^[7]及荧光免疫层析技术^[8].放射性免疫检测技术成本较低,但存在潜在的放射污染可能,由于试剂具有半衰期,每次操作都要做标准曲线,逐渐被非放射标记免疫测定技术所取代.酶联免疫吸附测定被广泛应用,但操作繁琐、费时费力,且准确性和灵敏度较低.电化学发光免疫分析广泛应用于定量检测 NT-proBNP,其中,罗

收稿日期 2017-09-18

作者简介 孙宏浩(1973-)男,教授,博士,湖北省“楚天学者计划”和“百人计划”学者,研究方向:靶向纳米药物和快速检测,纳米微球的表面修饰,微球和生物分子之间的相互作用机理,E-mail: 1048923282@qq.com

基金项目 国家自然科学基金资助项目(21501054,21401051);湖北省自然科学基金重点资助项目(2014CFA080);湖北省教育厅优秀中青年科技创新团队(T201705);湖北省大学生创新创业训练计划资助项目(201410500021)

氏(Roche) Elecsys 电化学发光免疫分析系统具有高灵敏性和准确性,常用于生物标志物的快速检测^[9],但需要大量样本才能降低成本,不适用于中小型机构及个人对 NT-proBNP 的定量和快速检测检测。此外,昂贵的检测设备及所需试剂使电化学发光免疫仪器在中小医疗机构很难普及,更无法用于 POCTs。目前,基于荧光标记物的免疫层析技术发展迅速,各种荧光标记物也不断涌现,如金磁复合纳米球 MNP@SiO₂@BSA@AuNPs 用以定量检测肌红蛋白^[10],荧光免疫层析技术与电化学发光免疫检测技术相比,该方法具有操作简单、成本低、检测快速,但检测灵敏度较低。

在 NT-proBNP 免疫层析检测中,由于 T 线抗体和抗原-荧光微球复合体仅有 15 s 的作用时间,因此在心力衰竭检测中 NT-proBNP 的有效检测限需要达到 20 ng · L⁻¹^[11]。在抗原浓度低、反应时间极短的条件下,单一的免疫层析技术很难实现对低浓度 NT-proBNP 的准确检测。利用生物素和链霉亲和素之间高度特异性亲和力以及多级放大效应,可提高免疫结合和示踪分析的灵敏度^[12]。目前,该技术已被广泛应用于追踪抗原和抗体,定性和定量检测以及追踪定位等研究中。生物素与链霉亲和素之间的结合力可达 10¹⁵ mol · L⁻¹,且两者结合快速,耐受性强,一旦形成高亲和力,就不会受到极端 pH、温度、有机溶剂以及其他变性剂的影响,这些因素对于纯化或检测结合蛋白均具有重要作用^[13]。因此,本文采用生物素-链霉亲和素系统与荧光免疫层析技术相结合的方法,以期实现简便、快速、灵敏检测 NT-proBNP(原理图见图 1)。

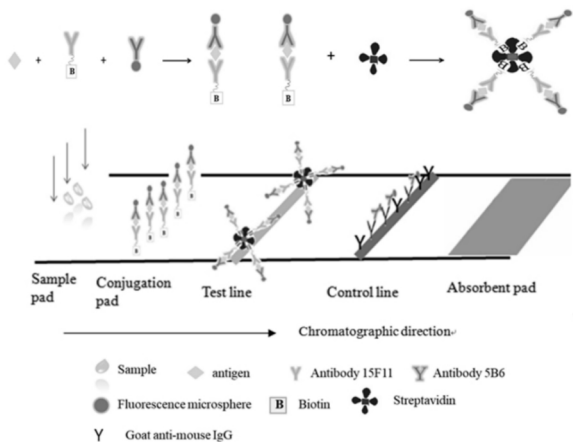


图1 生物素-链霉亲和素系统结合荧光免疫层析技术检测 NT-proBNP 的原理图

Fig.1 Schematic diagrams of biotin-streptavidin system combined with fluorescence immunochromatography for detecting NT-proBNP

1 实验部分

1.1 材料与仪器

MES 缓冲液、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)、*N*-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、PB(磷酸盐溶液)均购于国药集团化学试剂有限公司,抗体 5B6、抗体 15F11、抗体 15C4、抗体 13G12、抗体 24E11、抗体 29D12、抗体 18H5、抗体 16E6、NT-proBNP(Hytest Ltd)、牛血清白蛋白(BSA, Roche)、生物素-链霉亲和素(Sigma Aldic)、羊抗鼠 IgG(Abcam)、400 nm 荧光微球(北京华泰昕生物医疗)、PVC 底板、样品垫、吸水纸、硝酸纤维素膜均(上海金标生物技术)。

喷金划膜仪(XYZ-3050,美国 BIO-DOT)、切条机(HGS201,杭州峰航科技)、离心机(H-2050R,湖南长沙湘仪离心机仪器)、超声清洗器(DH-120DTN,上海狄昊实业)、旋转混匀仪(MX-RD-E, Biologix Group Ltd.)、荧光快速检测仪(HG-98,上海互幅科学仪器)、快速免疫分析仪(AQT90 FLEX,雷度米特医疗设备)。

1.2 抗体对的筛选

以抗体 5B6 为偶联抗体,选择合适抗体与 5B6 配对构成双抗体夹心模型。以 5B6 作为标记抗体,抗体 15C4、抗体 13G12、抗体 24E11、抗体 15F11、抗体 29D12、抗体 18H5、抗体 16E6 分别作为 T 线抗体,制备免疫层析试纸条,分别对浓度为 30000、9000、0 ng · L⁻¹的 NT-proBNP 进行检测,计算 T/C 值,绘制柱形图。

1.3 制备抗体 5B6 标记的荧光微球

吸取 100 μL 羧基荧光微球(400 nm),离心(转速 14400 r · min⁻¹, 10 min),分别用 1 mL 0.1 M 的 MES 缓冲液清洗两次,用 5 mL MES 缓冲液溶解 1.0 mg EDC 及 1.0 mg NHS,室温离心反应 45 min(转速 60 r · min⁻¹),用 10 mM pH 7.4 的 PB(1 mL)溶液清洗 2 次,500 μL PB 复溶,加入 7.04 μL 抗体 5B6(7.1 mg · mL⁻¹),4℃ 过夜反应,离心(转速 14400 r · min⁻¹, 8 min),加入 125 μL BSA,在 10 mM pH 7.4 PB 中室温封闭 1 h,再次离心(转速 14400 r · min⁻¹, 8 min),用 10 mM PB(1 mL)清洗,以 100 μL 保存液复溶,4℃ 保存。

1.4 生物素化抗体的制备

取 100 μg 抗体 15F11,按抗体/生物素摩尔比为 1:100 的比例加入生物素,总体积为 100 μL,室温下培育 4 h,使用 PB 缓冲液稀释至反应液体积的 5 倍,4℃ 下透析 72 h,取出备用。

1.5 免疫层析试纸条的制备

在聚氯乙烯板上使用样品垫、硝酸纤维膜及吸水纸组装免疫层析试纸条。在 NC 膜上,以 $0.6 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 抗体 15F11 作为 T 线, $0.1 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 羊抗鼠 IgG 作为 C 线,切割为 4 mm 的条状,将试纸条置于卡壳中常温干燥保存。

1.6 生物素-链霉亲和素联合免疫层析试纸条的制备

以 $2.5 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 的链霉亲和素以及浓度为 $0.5 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 的羊抗鼠 IgG 分别作为检测卡的 T 线和 C 线。将处理完成的 NC 膜置于 37°C 恒温干燥箱中干燥 10~12 h,最后将样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜(NC 膜)、吸收垫、PVC 底板组装起来,切割成约 4 mm 的条状试纸条,将试纸条置于卡壳中常温干燥保存。

1.7 NT-proBNP 的定量检测

使用 1.5 中制备的免疫层析试纸条,在样品垫处分别滴加浓度为 30, 20, 9, 5, 3, 1.5, 0.9, 0.5, 0.2, 0.15, 0.02 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的标准样品,并与 1.3 制备的荧光微球 0.5 μL 反应 1 min,取 pH 7.4 的 PB 缓冲溶液作为层析液,分别检测 T 线及 C 线的荧光强度,计算 T/C 值,绘制 T/C-浓度标准曲线。

使用 1.6 中制备的新型试纸条,将 1.3 制备的荧光微球 0.125 μL 与 1.4 中制备的生物素化抗体 2 μL 混合,滴加至结合垫处,以 200 mM pH 7.4 的 PB 缓冲溶液作为层析液,分别取浓度为 30, 20, 9, 5, 3, 1.5, 0.9, 0.5, 0.2, 0.15, 0.02 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的标准样品添加至样品垫处,反应 1 min,检测 T 线及 C 线的荧光强度,计算 T/C 值,绘制 T/C-浓度标准曲线。

1.8 全血检测

使用 1.6 中制备的新型试纸条对 4 组血液样本(编号 A1, A2, A3, A4)进行免疫层析检测,并根据 1.7 中标准曲线计算血液样本中 NT-proBNP 浓度。运用雷度快速免疫分析仪对相同血液样本进行检测,比较两者所测结果。

2 结果与分析

2.1 抗体对的筛选结果

以 5B6 作为标记抗体,选择 7 个不同的抗体对进行免疫层析试验,并针对不同浓度 NT-proBNP 进行检测,通过层析结果,计算每组的 T/C 值,结果如图 2。由图 2 可知:以 5B6 作为标记抗体,15F11 作为划线抗体时,不同浓度 T/C 值区分度较大,故而选择 5B6-15F11 为最佳抗体对。

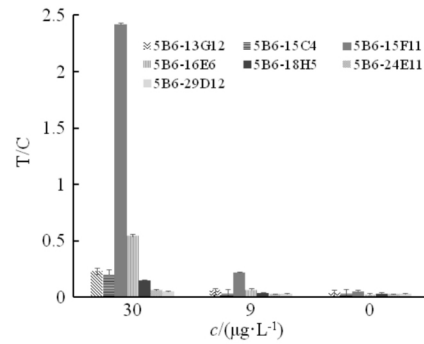


图 2 不同抗体对的免疫层析试验结果

Fig.2 Immunochromatographic test results of different antibody pairs

2.2 免疫层析方法检测 NT-proBNP

用免疫层析方法检测 NT-proBNP 结果见图 3。由图 3 可知:当浓度为 $0.02 \sim 0.5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, T 线无荧光信号;浓度为 $0.5 \sim 9 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, T 线荧光强度较低,且 T/C 值区分度差;浓度为 $20 \sim 30 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, T 线荧光强度较高。

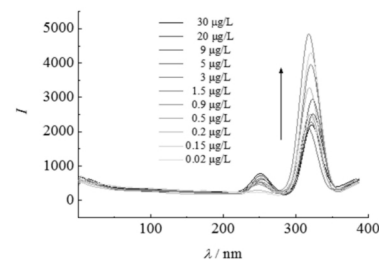


图 3 免疫层析法检测 NT-proBNP 的荧光光谱

Fig.3 NT-proBNP fluorescence spectra by immunochromatographic assay

NT-proBNP 浓度与 T/C 值的关系曲线见图 4。由图 4 可知:在较低浓度下, T/C 区分度较低,且与浓度无明显相关性,故在较低浓度范围内,常规免疫层析方法并不能在 T 线实现对抗原-抗体的快速捕捉,无法对低浓度 NT-proBNP 进行定量检测。

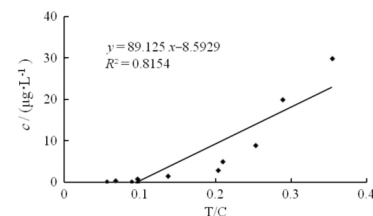


图 4 NT-proBNP 浓度与 T/C 值的关系曲线

Fig.4 Relationship curve of NT-proBNP concentration and T/C value

2.3 生物素-链霉亲和素联合免疫层析检测 NT-proBNP

生物素-链霉亲和素联合免疫层析检测 NT-

proBNP 检测结果见图 5。图 5 显示: 在不同 NT-proBNP 浓度下 检测线和质控线的荧光强度区分度良好,且在较低浓度范围(0.02~0.2 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 内,该方法仍能实现 T 线链霉亲和素对生物素-15F11-抗原-5B6-荧光微球复合体的高效捕获。

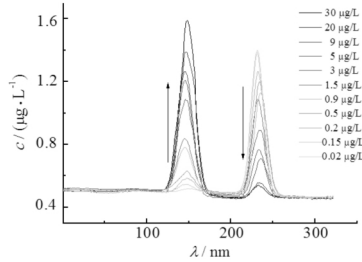


图 5 生物素-链霉亲和素联合免疫层析检测 NT-proBNP 的荧光光谱

Fig.5 NT-proBNP fluorescence spectra by biotin-streptavidin system combined with immunochromatographic assay

为进一步证明联合检测方法的可行性 绘制 T/C 值与抗原浓度的关系曲线结果见图 6。如图 6 所示,两

者呈较好的线性关系。

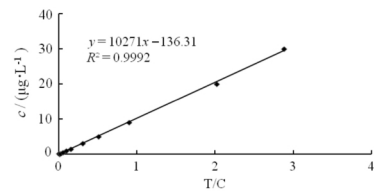


图 6 NT-proBNP 浓度与 T/C 值的关系曲线

Fig.6 Relationship curve of NT-proBNP concentration and T/C value

2.4 全血层析结果

使用新型免疫层析试纸条对 A1, A2, A3, A4 四组血样进行 NT-proBNP 快速检测,并运用雷度快速免疫分析仪对相同血样进行定量检测,对比两者检测结果,如表 1 所示。由表 1 可知:针对不同全血样品,对比本试验研制的新型免疫层析试纸条所测 NT-proBNP 浓度与雷度快速免疫分析仪定量检测结果,两者差异较小。因此,生物素-链霉亲和素系统结合免疫层析技术制备的试纸条可用于临床快速检测中。

表 1 全血检测结果

Tab.1 Test results of the whole blood

全血样品	组别	T/C	检测值/($\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$)	CV 值	雷度测试值/($\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$)
A1	1	0.0329	153.61	0.0417	173
	2	0.0347	143.92		
	3	0.0342	159.30		
A2	1	0.0322	212.65	0.0759	225
	2	0.0285	209.23		
	3	0.0290	211.55		
A3	1	0.4243	4221.64	0.0223	4870
	2	0.4470	4455.09		
	3	0.4397	4380.21		
A4	1	0.0510	387.31	0.0110	415
	2	0.0465	381.20		
	3	0.0395	377.09		

3 结语

本试验利用生物素-链霉亲和素系统的高亲和力以及多级放大效应,结合免疫荧光技术制备新型免疫荧光试纸条。试验结果表明,相较于常规免疫层析技术,新型免疫层析试纸条 NT-proBNP 在低浓度下(0.02 ~ 0.2 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 仍具有较好的区分度, T/C 值与抗原浓度呈良好的线性关系。在全血检测中,对比新型免疫层析试纸条检测结果与雷度检测结果,两者相差较小。生物素链霉亲和素系统联合免疫层析技术优于常规免疫层析检测技术,可广泛应用于床旁检验(POCTs) 等临床诊断阶段。

参 考 文 献

- [1] McKie P, Burnett J C Jr. NT-proBNP: The gold standard biomarker in heart failure [J]. J Am Coll Cardiol 2016, 68 (22): 2437-2439.
- [2] Zheng Y R, Ye L F, Cen X J, et al. Low NT-proBNP levels: An early sign for the diagnosis of ischemic heart failure [J]. Int J Cardiol 2017, 228: 666-671.
- [3] 杨春莉, 裘宇容, 周芳, 等. 血清 N 端前体脑钠肽在心血管病患者的表达及其临床意义 [J]. 南方医科大学学报 2008, 28(5): 866-869.

(下转第 15 页)

- and their biological applications [J]. *Nanoscale*, 2013, 5(6): 2322-2327.
- [6] Xiong W W, Yang G H, Wu X C, et al. Aqueous Synthesis of Color-Tunable CuInS₂/ZnS Nanocrystals for the Detection of Human Interleukin 6 [J]. *ACS Appl Mater Interfaces* 2013, 5(16): 8210-8216.
- [7] Deng D, Qu L, Cheng Z, et al. Highly luminescent water-soluble quaternary Zn-Ag-In-S quantum dots and their unique precursor S/In ratio-dependent spectral shifts [J]. *J Lumin* 2014, 146(1): 364-370.
- [8] Deng D, Cao J, Qu L, et al. Highly luminescent water-soluble quaternary Zn-Ag-In-S quantum dots for tumor cell-targeted imaging [J]. *Phys Chem Chem Phys* 2013, 15(14): 5078-5083.
- [9] Wang J, Zhang R, Bao F, et al. Water-soluble Zn-Ag-In-Se quantum dots with bright and widely tunable emission for biomedical optical imaging [J]. *Rsc Advances* 2015, 5(108): 88583-88589.
- [10] Wang J, Zhou X, Ma H, et al. Diethyldithiocarbamate functionalized CdSe/CdS quantum dots as a fluorescent probe for copper ion detection [J]. *Spectrochimica Acta A* 2011, 81(1): 178-183.
- [11] Lu X, Zhao Y, Zhang J, et al. Copper ion-induced fluorescence band shift of CdTe quantum dots: a highly specific strategy for visual detection of Cu²⁺ with a portable UV lamp [J]. *Analyst*, 2015, 140(23): 7859-7863.
- [12] Sun X, Liu P, Wu L, et al. Graphene-quantum-dots-based ratiometric fluorescent probe for visual detection of copper ion [J]. *Analyst* 2015, 140(19): 6742-6747.
- [13] 冷泽山. 新型铜钼硫基多色量子点的制备及其性能研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2014.

(责任编辑 刘 钊)

(上接第9页)

- [4] 张勇法, 杨建英. 免疫学检测技术在真菌毒素及兽药残留检测中的应用 [J]. *中国饲料* 2014(16): 33-35.
- [5] Sallam K M, Sidkey N M, Abed N N, et al. Lipopolysaccharide-stimulated interleukin-6 production for radioimmunoassay [J]. *J Radioanal NuclCh* 2017, 313(2): 445-453.
- [6] Marri L, Jansson A M, Christensen C E, et al. An enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of diacetyl (2,3-butanedione) [J]. *Anal Biochem*, 2017, 535: 12-18.
- [7] Liu Q, Liu X P, Wei Y P, et al. Electrochemiluminescence immunoassay for the carcinoembryonic antigen using CdSe: Eu nanocrystals [J]. *Microchimica Acta*, 2017, 184(5): 1353-1360.
- [8] Nardo F D, Anfossia L, Giovannolia C, et al. A fluorescent immunochromatographic strip test using Quantum Dots for fumonisins detection [J]. *Talanta* 2016, 150: 463-468.
- [9] 王明良, 范金芬. (Roche) 罗氏全自动电化学发光分析仪的评价 [J]. *医学信息旬刊* 2010, 23(4): 219-220.
- [10] 孙宏浩, 王甜甜, 廖天作, 等. 金磁复合纳米球的制备及其在检测肌红蛋白中的应用 [J]. *中南民族大学学报(自然科学版)* 2017, 36(1): 8-12.
- [11] Zhang X G, Shu Y G, Gao J, et al. A new method for blood nt-probnp determination based on a near-infrared point of care testing device with high sensitivity and wide scope [J]. *Biomed EnvironSci*, 2017, 30(6): 426-431.
- [12] 杨林, 罗富里, 李赞, 等. 利用生物素-链霉亲和素进行骨髓间充质干细胞表面标记 [J]. *中国组织工程研究* 2016, 20(10): 1382-1388.
- [13] 陈瑜, 胡爱国. 新型生物素标记的苦杏仁苷活性探针的合成 [J]. *合成化学*, 2015, 23(4): 346-349.

(责任编辑 刘 钊)